



(51) 国際特許分類6 A61K 38/18, 9/14, 47/02, 47/10, 47/12, 47/18, 47/36	A1	(11) 国際公開番号 WO97/02832 (43) 国際公開日 1997年1月30日 (30.01.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01898 (22) 国際出願日 1996年7月8日 (08.07.96) (30) 優先権データ 特願平7/199018 1995年7月11日 (11.07.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区苗穂町6-1-1 Hokkaido, (JP) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2-2-8 Osaka, (JP) (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 田中克実(TANAKA, Katsumi)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市玉川1-9-1 住友化学高槻社宅110 Osaka, (JP) 東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)[JP/JP] 〒350 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: LYOPHILIZED HGF PREPARATIONS (54)発明の名称 HGF凍結乾燥製剤 (57) Abstract A lyophilized HGF preparation prepared by lyophilizing an aqueous HGF solution, and a lyophilized HGF preparation further containing a stabilizer, sodium chloride, a buffer and/or a surfactant, or other additive(s). The lyophilized preparations can stabilize HGF and enables long-term storage.		

(57) 要約

本発明は、HGFを含有する水溶液を凍結乾燥したHGF凍結乾燥製剤、及び安定化剤、塩化ナトリウム、緩衝剤及び／又は界面活性剤等を添加したHGF凍結乾燥製剤に関する。本発明によれば、HGFを安定化させることができ、長期間の保存が可能となった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	VI	ヴァティカン共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国					VN	ヴェトナム

明 細 書

HGF凍結乾燥製剤

5 技術分野

本発明は、HGF (Hepatocyte Growth Factor)を含有する溶液を凍結乾燥することにより得られる、HGF凍結乾燥製剤に関する。さらに詳しくは、安定化剤、塩化ナトリウム、緩衝剤、又は界面活性剤の少なくとも一種以上を含有する、前記HGF凍結乾燥製剤に関する。本発明により、HGFを安定化させた、長期保存の可能な製剤が提供される。

背景技術

HGFは肝実質細胞の増殖活性を有する蛋白質であり、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されており、その名称も、HGF、TCF、SCF等が使用されている。本発明では、これらの公知の肝実質細胞増殖活性を有する蛋白質をHGFと総称する。

HGFは様々な薬理作用を示す生理活性ペプチドであり、その薬理作用については、例えば実験医学 Vol.10, No.3 (増刊) 330-339 (1992)に記載されている。HGFはその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤、育毛促進剤等(日本特開平4-18028号公報、日本特開平4-49246号公報、EP 492614号公報、日本特開平6-25010号公報、WO 93/8821公報、日本特開平6-172207号公報、日本特開平7-89869号公報、日本特開平6-40934号公報、WO 94/2165公報、日本特開平6-40935号公報、日本特開平6-56692号公報、日本特開平7-41429号公報、WO 93/3061公報、日本特開平5-213721号公報等)としての開発が期待されている。

HGFの製剤については、WO 90/10651公報及び日本特開平6-247872号公報に記載がある。上記WO 90/10651公報は、HGFと比較してアミノ酸5残基が欠失したデリ

ーションタイプのHGF (dLeHGF) について開示されており、TCFIIと称している。この明細書では、アルブミン、ヒト血清、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等がHGFを安定化することを開示している。これらは、水溶液製剤に関するものであり、HGFを水溶液中で安定化させる。また、日本特
5 開平6-247872号公報は塩基性アミノ酸等とHGF (TCF) を共存させることにより、HGFを高濃度に含有させた製剤について開示している。

ところで、タンパク質は一般に凍結操作においてそれほど安定ではない（「蛋白質 核酸 酵素」 37(9), 1517 (1992)）。また、水溶液中におけるタンパク質の安定化剤は、水分子とタンパク質との相互作用によって安定化させるものであり、従っ
10 て、水の存在しないタンパク質の凍結乾燥品においては、水溶液におけるタンパク質の安定化剤は、多くの場合、安定化効果を示さない（「蛋白質 核酸 酵素」 37(9), 1517 (1992)）。

一方、HGFの凍結乾燥製剤についてはまったく知られておらず、またHGFの凍結乾燥製剤がどの程度の物理的及び生物活性的安定性を示すかは予想することが
15 できなかった。

HGFの水溶液製剤自体は、低温又は室温で数日間保存すると、凝集、白濁、ゲル化が認められ、性状が変化し、類縁体・重合体が形成される等、物理的安定性が低く、また生物活性が低下する等、生物活性安定性が低く、長期間の保存に対し安定な製剤ではない。そのことは、HGFを注射用製剤等とした医薬又は動物薬としての開発に大きな障害となっていた。本発明は上記の従来の課題を解決するものである。即ち、本発明の目的は、医療用医薬品又は動物用薬として長期間の保存でも安定な製剤の提供にある。

発明の開示

25 本発明は、HGF凍結乾燥製剤である。当該HGF凍結乾燥製剤は、グリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール、デキストラン硫酸などの安定化剤を含有していてもよく、またクエン酸塩などの緩衝剤を含有していてもよい。

また、本発明の他の発明は、安定化剤、塩化ナトリウム、緩衝剤及び界面活性剤を含有するHGF凍結乾燥製剤である。

30 本発明のHGF凍結乾燥製剤においては、HGFが安定化され、長期保存が可能

となる。

発明を実施するための最良の形態

本発明に使用されるHGFとしては、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で精製されたものを用いることができる。

HGFの精製方法としては、各種の方法が知られている。例えば、ラット、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物の肝臓、脾臓、肺臓、骨髓、脳、腎臓、胎盤等の臓器、血小板、白血球等の血液細胞や血漿、血清などから抽出、精製して得ることができる(FEBS Letters, 224, 312, 1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5844, 1989など参照)。

また、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物(培養上清、培養細胞等)から分離精製してHGFを得ることもできる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる(例えば、Nature, 342, 440, 1989、WO 92/01053公報、日本特開平5-111383号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989など参照)。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物又は動物細胞などを用いることができる。

より具体的には、HGFを生体組織から抽出精製する方法としては、例えば、ラットに四塩化炭素を腹腔内投与し、肝炎状態にしたラットの肝臓を摘出して粉碎し、S-セファロース、ヘパリンセファロースなどのゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC等の通常の蛋白質精製法にて精製することができる。

また、遺伝子組換え法を用い、ヒトHGFのアミノ酸配列をコードする遺伝子を、ウシパピローマウィルスDNAなどのベクターに組み込んだ発現ベクターによって動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、マウスC127細胞、サルCOS細胞などを形質転換し、その培養上清より得ることができる。

かくして得られたHGFは、肝細胞の増殖効果を有していれば、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合し

ていたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されていてもよい。

「HGF凍結乾燥製剤」とは、HGFを含有する水溶液を通常の凍結乾燥方法で凍結乾燥した製剤をいう。

5 「安定化剤」としては、グリシン、アラニン等のアミノ酸類、ヘパリン、デキストラン硫酸等の多糖類、ソルビトール、マンニトール等の糖アルコール等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。安定化剤を加えて製造したHGF凍結乾燥製剤は、さらにHGFの保存安定性が増した製剤である。好ましい安定化剤は、グリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール、デキストラン硫酸等が挙げられる。例えば、グリシン、アラニン、ソルビトール又はマンニトールの添加量として好ましいのは、HGFの重量に対して、0.01-100倍の重量が挙げられ、特に好ましいのは、0.1-10倍の重量が挙げられる。

15 「緩衝剤」としては、例えばリン酸バッファー、クエン酸バッファー等が挙げられる。緩衝剤は、再溶解後の水溶液のpHを調整しHGFの溶解性を保つ作用を有する。すなわち、例えば実施例で使用した組換HGFの場合、pHによってHGFの溶解度は変化し、pH7付近では0.1-5.0mg/mlの溶解度を示すが、pH5付近では20mg/ml以上の溶解度を示すため、pHを5.0-6.0にするのが好ましい。緩衝剤として好ましいものは、クエン酸バッファーが挙げられ、特に好ましくはクエン酸ナトリウムバッファーが挙げられる。このクエン酸バッファーは、再溶解後の水溶液中でのHGFの安定化にも寄与する。緩衝剤の添加量として好ましい範囲は、例えば再溶解後の水量に対し、1-100mMとなる範囲が挙げられる。

25 「界面活性剤」としては、例えばポリソルベート20、ポリソルベート80、ブルロニックF-68、ポリエチレングリコール等が挙げられ、二種以上を併用してもよい。界面活性剤として特に好ましくは、ポリソルベート80を挙げることができる。HGFは容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすい。従って、界面活性剤を添加することによって、再溶解後のHGFの容器への吸着を防止することができる。界面活性剤の添加量として好ましい範囲は、例えば再溶解後の水重量に対し、0.001-2.0%の重量の範囲が挙げられる。

30 「塩化ナトリウム」はHGFの溶解性を保つ作用を有する。すなわち、例えば実施例で使用した組換HGFの場合、塩化ナトリウムの添加により溶解度が向上し、

特に300mM以上では著しく溶解性が向上する（日本特開平6-247872号公報）。塩化ナトリウムの添加量は浸透圧比により制限を受けるが、一般的に用いられる注射剤の浸透圧比を示す量でよい。特に医療用又は動物薬用注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比1-2が好ましく、例えば再溶解後の水量に対し150-300mMとすることが好ましい。

HGF凍結乾燥製剤は、HGFを含有する水溶液を通常の凍結乾燥方法で凍結乾燥することで製造できる。例えば、HGFを適切な溶剤（例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、必要に応じて、安定化剤、緩衝剤、界面活性剤、塩化ナトリウム等を加え、凍結乾燥する。本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでもよい。凍結乾燥方法としては、例えば、①常圧下で冷却凍結する凍結過程、②溶質に拘束されない自由水を減圧下で昇華乾燥する1次乾燥過程、③溶質固有の吸着水や結晶水を除去する2次乾燥過程の3つの単位操作による方法が挙げられる（Pharm. Tech. Japan, 8(1), 75-87 (1992)）。HGFは、溶液調製時、凍結乾燥時、及びその凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液において、非常に安定である。なお、HGF含量は、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜調整することができる。

凍結乾燥製剤は、使用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

産業上の利用可能性

本発明のHGF凍結乾燥製剤は、HGFを安定化させることができ、長期間の保存が可能となった。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。なお、本実施例においては、WO 90/10651公報に記載のdLeHGF（5アミノ酸欠失型HGF、別名TCFII）を用いた。

実施例1

HGF凍結乾燥製剤の作製

300mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)にHGF20mg/mlとなるように溶解し、無菌的にHGF水溶液を得た。本水溶液のpHを調整した後、無菌的にバイアルに充填し、表1に示す条件に従って凍結乾燥して、HGF凍結乾燥製剤を得た。なお、表

表1

	凍結過程		1次乾燥過程		2次乾燥過程	
温度(°C)	5 → -40	-40	-40 → 0	0	0 → 20	20
時間(hr)	1	10	8	24	1	24
圧力(mmHg)	760	760	<1	<1	<1	<1

実施例2

HGF凍結乾燥製剤の作製

実施例1において、10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)の代わりに10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いて、HGF凍結乾燥製剤を得た。

実施例3

HGF凍結乾燥製剤の作製

実施例1において、10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)の代わりに10mMリン酸緩衝液(pH6.0)を用いて、HGF凍結乾燥製剤を得た。

実施例4

HGF凍結乾燥製剤の作製

実施例1において、10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)の代わりに10mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、HGF凍結乾燥製剤を得た。

実施例5

HGF凍結乾燥製剤の作製

300mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMクエン酸緩衝液(pH5)にHGF20mg/mlとなるように溶解した。続いて、

グリシンを50mg/mlになるよう溶解し、無菌的にHGF溶解液を得た。本溶解液のpHを調整した後、無菌的にバイアルに充填し、実施例1の凍結乾燥の条件と同様の条件によりHGF凍結乾燥製剤を得た。

5 実施例6

HGF凍結乾燥製剤の作製

実施例5において、グリシンの代わりにアラニンを用いて、HGF凍結乾燥製剤を得た。

10 実施例7

HGF凍結乾燥製剤の作製

300mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMクエン酸緩衝液(pH5)にHGF20mg/mlとなるように溶解した。続いて、ソルビトールを200mg/mlになるよう溶解し、無菌的にHGF溶解液を得た。
15 本溶解液のpHを調整した後、無菌的にバイアルに充填し、実施例1の凍結乾燥の条件と同様の条件によりHGF凍結乾燥製剤を得た。

実施例8

HGF凍結乾燥製剤の作製

20 300mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMクエン酸緩衝液(pH6)にHGF10mg/mlとなるように溶解した。続いて、デキストラン硫酸を50mg/mlになるよう溶解し、pHを調整して、HGF溶解液を得た。次いで、バイアル充填し、実施例1の凍結乾燥の条件と同様な条件によりHGF凍結乾燥製剤を得た。

25

実施例9

HGF凍結乾燥製剤の作製

実施例1において、10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)の代わりに10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用い、またHGF濃度を10mg/mlとして、
30 HGF凍結乾燥製剤を得た。

試験例 1

HGFの生物活性に及ぼす凍結乾燥過程の影響

凍結乾燥製過程におけるHGFの生物活性の変化を確認するため、実施例1において、凍結乾燥前のHGF水溶液及び凍結乾燥後そのまま再溶解したHGF水溶液を用いてHGFの生物活性を測定した（生物活性測定法は以下に示す）。その結果を表2に示す。凍結乾燥前後で比活性に変化が認められなかったことから、凍結乾燥過程及び再溶解においてHGFの生物活性は失活せず、HGFを凍結乾燥製剤とすることが可能であることが示された。

生物活性測定方法

Wistar系雄性ラットを肝灌流して得られた肝細胞を精製し、細胞生存率を確認後、 1×10^4 /wellでプレートに播種した。5%炭酸ガスインキュベータでのプレインキュベーション20時間後、HGFサンプル及び標準品を添加した（ $n=3$ ）。さらに、5%炭酸ガスインキュベータでのプレインキュベーション24時間後、 $[^3\text{H}]$ -チミジンを添加し、2時間ラベルした。細胞をセルハーベスターで回収し、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ 量を測定した。測定結果を平行線検定法にかけ、標準品に対する比活性を求めた。

表 2

凍結乾燥前後における生物活性	
サンプル	比活性
凍結乾燥前 溶液製剤	0.89
凍結乾燥製剤 溶解直後	0.94

試験例 2

凍結乾燥製剤溶解後の性状

実施例で作製した凍結乾燥製剤を、 -40°C 、 25°C 、 50°C にて1ヶ月間保存後、溶解し、溶解後の性状を目視により観察した。凍結乾燥製剤の溶解は精製水で行った。その結果を表3に示す。 -40°C 及び 25°C の保存において、いずれの実施例の製剤も性状に関して安定であった。また、 50°C の保存においては、実施例1の製剤は溶解直後白濁したが、実施例5、6及び7の製剤は性状に関して安定で

あった。

表 3

凍結乾燥製剤溶解後の性質(1ヶ月保存品)			
製剤	性 状		
	-40℃	25℃	50℃
実施例 1	澄明	澄明	白濁
実施例 5	澄明	澄明	澄明
実施例 6	澄明	澄明	澄明
実施例 7	澄明	澄明	澄明

試験例 3

凍結乾燥製剤における重合体含量変化

実施例 1、5、6 及び 7 で作製した凍結乾燥製剤を、-40℃、25℃、40℃、50℃にて1ヶ月間又は2ヶ月間保存し、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量とHGF含量の比を測定した。測定方法は以下に示すゲルろ過法を使用した。その結果を表4及び表5に示す。いずれの温度の保存においても、いずれの実施例の製剤も重合体の生成は少なく物理的に安定であった。また、特に実施例5、6及び7の製剤は重合体の生成は極端に少なく物理的に安定であった。

重合体含量測定方法

HGF濃度を2mg/mlに希釈後、ゲル濾過法を用いて、下記の条件で測定した。

カラム : TOSOH TSK G-3000SW XL (φ0.78×30cm)

流速 : 0.5 ml/min

検出 : OD 280

温度 : 25℃

キャリアー : 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% SDS, pH 7.0

アプライ : 20 µl

重合体の保持時間 : 13.0 min

HGFの保持時間 : 14.4 min

表4

1ヶ月保存の凍結乾燥製剤の重合体含量/HGF含量				
	-40℃	25℃	40℃	50℃
実施例1	1.07 %	1.59 %	2.76 %	6.17 %
実施例5	0.92 %	1.39 %	1.83 %	4.09 %
実施例6	0.93 %	1.54 %	1.81 %	2.90 %
実施例7	0.90 %	1.35 %	2.57 %	6.64 %

表5

2ヶ月保存の凍結乾燥製剤の重合体含量/HGF含量				
	-40℃	25℃	40℃	50℃
実施例1	0.92 %	1.44 %	3.91 %	12.23 %
実施例5	0.88 %	1.21 %	2.49 %	7.49 %
実施例6	0.85 %	1.10 %	1.96 %	5.76 %

試験例4

重合体生成に及ぼすデキストラン硫酸の影響

実施例8で調製した凍結乾燥製剤を、50℃にて1ヶ月保存し、その凍結乾燥製剤に含まれる重合体含量とHGF含量の比を測定した。なお、測定は試験例3と同様にして行った。また、比較例として、デキストラン硫酸を含まない点以外は同様な成分及び方法により調製されている実施例9の凍結乾燥製剤を用いて、同様な試験を行った。その結果を表6に示す。表6に示されるように、デキストラン硫酸を添加することにより、高温保存しても重合体の生成は少なく、安定性が向上することが判明した。

表6

凍結乾燥製剤の重合体含量/HGF含量		
	保存開始前	50℃, 1ヶ月保存後
実施例8	2.46 %	9.45 %
実施例9	1.78 %	14.01 %

試験例 5

凍結乾燥製剤の生物活性変化

実施例 1、5、6 及び 7 で作製した凍結乾燥製剤を、 -40°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C にて1ヶ月間又は2ヶ月間保存し、その凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液の生物活性を、試験例 1 に示す生物活性測定方法で測定した。その結果を表 7 及び表 8 に示す。なお、実施例 1、5、6 及び 7 の製剤の再溶解後の水溶液の生物活性の初期値は、それぞれ 1.01 ± 0.25 、 0.91 ± 0.18 、 0.88 ± 0.05 、 1.03 ± 0.04 であった。 60°C の保存では、やや生物活性に低下傾向が見られるものの、 50°C 以下の保存では、いずれの実施例の製剤も生物活性に殆ど変化はなく、生物活性的に安定であった。

表 7

1ヶ月保存の凍結乾燥製剤の生物活性（比活性）				
	-40°C	40°C	50°C	60°C
実施例 1	0.96 ± 0.13	0.92 ± 0.13	0.81 ± 0.07	0.54 ± 0.05
実施例 5	0.80 ± 0.14	0.99 ± 0.10	0.80 ± 0.16	0.72 ± 0.03
実施例 6	0.92 ± 0.14	1.02 ± 0.06	0.94 ± 0.08	0.78 ± 0.03
実施例 7	0.92 ± 0.02	0.97 ± 0.04	0.83 ± 0.06	---

表 8

2ヶ月保存の凍結乾燥製剤の生物活性（比活性）			
	-40°C	40°C	60°C
実施例 1	1.14 ± 0.14	0.98 ± 0.01	0.46 ± 0.09
実施例 5	0.95 ± 0.05	0.84 ± 0.09	0.57 ± 0.01
実施例 6	1.11 ± 0.14	1.09 ± 0.03	0.52 ± 0.02

請求の範囲

1. HGF凍結乾燥製剤。
2. 安定化剤を含有する請求の範囲1記載のHGF凍結乾燥製剤。
- 5 3. 安定化剤がグリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール又はデキストラン硫酸である請求の範囲2記載のHGF凍結乾燥製剤。
4. 緩衝剤を含有する請求の範囲1から3の何れかに記載のHGF凍結乾燥製剤。
5. 緩衝剤がクエン酸塩である請求の範囲4記載のHGF凍結乾燥製剤。
- 10 6. 安定化剤、塩化ナトリウム、緩衝剤及び界面活性剤を含有するHGF凍結乾燥製剤。

15

20

25

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K38/18, 9/14, 47/02, 47/10, 47/12, 47/18, 47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K38/18, 9/14, 47/02, 47/10, 47/12, 47/18, 47/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 6-40935, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), February 15, 1994 (15. 02. 94) & EP, 588477, A	1 - 6
X	JP, 6-40938, A (Toshikazu Nakamura and another), February 15, 1994 (15. 02. 94) (Family: none)	1 - 6
X	JP, 6-172207, A (Toshikazu Nakamura and another), June 21, 1994 (21. 06. 94) (Family: none)	1 - 6
X	JP, 6-247872, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), September 6, 1994 (06. 09. 94) & EP, 612530, A & US, 5510327, A	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 26, 1996 (26. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

October 8, 1996 (08. 10. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ A 61 K 38 / 18, 9 / 14, 47 / 02, 47 / 10, 47 / 12, 47 / 18, 47 / 36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ A 61 K 38 / 18, 9 / 14, 47 / 02, 47 / 10, 47 / 12, 47 / 18, 47 / 36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
×	J P, 6-40935, A, (雪印乳業株式会社) 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) & E P, 588477, A	1-6
×	J P, 6-40938, A, (中村敏一 他) 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) (ファミリーなし)	1-6
×	J P, 6-172207, A, (中村敏一 他) 21. 6月. 1994 (21. 06. 94) (ファミリーなし)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 09. 96

国際調査報告の発送日

08.10.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司 印

4C

8314

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 6-247872, A, (雪印乳業株式会社) 6. 9月. 1994 (06. 09. 94) &EP, 612530, A, &US, 5510327, A	1-6